

## Production of phosphatidylserine comprises treating an aqueous lecithin dispersion with L-serine, phospholipase D and calcium chloride

Patent Number: DE19917249

Publication date: 2000-09-07

Inventor(s): SCHNEIDER MICHAEL (DE); SCHMITT HEIDI (DE); VOLLAND MICHAEL (DE)

Applicant(s): MEYER LUCAS GMBH & CO (DE)

Requested Patent:  DE19917249

Application Number: DE19991017249 19990416

Priority Number(s): DE19991017249 19990416; DE19991008689 19990226

IPC Classification: C12P13/06; C12P9/00; C07F9/10

EC Classification: C12P13/06, C07F9/10K

Equivalents:

### Abstract

Production of phosphatidylserine (PS) or PS-enriched products by adding L-Ser to a 1-20% aqueous dispersion of lecithin, adding a phospholipase D and CaCl<sub>2</sub> solution to the dispersion, stirring the mixture at room temperature for 10-20 hours, separating the resulting PS-Ca salt from the aqueous phase, washing the Ca salt with water to remove L-Ser and Cl, and extracting the product with ethanol.

BEST AVAILABLE COPY



(9) BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

(1) Offenlegungsschrift  
(10) DE 199 17 249 A 1

(5) Int. Cl.<sup>7</sup>:  
C 12 P 13/06  
C 12 P 9/00  
C 07 F 9/10

DE 199 17 249 A 1

(21) Aktenzeichen: 199 17 249.8  
(22) Anmeldetag: 16. 4. 1999  
(43) Offenlegungstag: 7. 9. 2000

<p>(6) Innere Priorität: 199 08 689. 3 26. 02. 1999</p> <p>(7) Anmelder: Lucas Meyer GmbH &amp; Co, 20539 Hamburg, DE</p> <p>(14) Vertreter: Epping, Hermann &amp; Fischer GbR, 80339 München</p>	<p>(7) Erfinder: Schmitt, Heidi, 21521 Aumühle, DE; Schneider, Michael, Dr., 21224 Rosengarten, DE; Volland, Michael, 21441 Garstedt, DE</p> <p>(6) Entgegenhaltungen: EP 07 76 976 A2 Chemical Abstracts Vol. 114, Nr. 38 740; Chemical Abstracts Vol. 87, Nr. 98 415; Patent Abstracts of Japan, JP 02-00 79 990 A; Biosis Abstracts Nr. 1992:34 64 91; Biosis Abstracts Nr. 1989:38 01 20;</p>
---	---

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(8) Verfahren zur Herstellung von Phosphatidylserin (PS) und PS in Weichgelatinekapseln

(5) Die Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Herstellung von Phosphatidylserin (PS) bzw. von PS angereicherten Produkten, bei welchem Lecithin in Wasser dispergiert und D-, L- oder D,L-Serie hinzugegeben wird. Phospholipase D und CaCl<sub>2</sub> werden in Wasser gelöst in die Dispersion überführt. Nach 10 bis 20 h Rühren bei Raumtemperatur wird das Calciumsalz des PS aus der wässrigen Phase abgetrennt, das freie L-Serin und Cholin im PS wird ausgewaschen. Durch abschließende Ethanolextraktion werden PS bzw. PS angereicherte Produkte erhalten, die keine Restenzymaktivität aufweisen.

DE 199 17 249 A 1

## Beschreibung

Bekannte Verfahren zur Herstellung von PS basieren auf folgenden Merkmalen:

- Reaktionen in zweiphasigen Systemen,
- Verwendung von Toluol, MIBK, Diethylether oder Ethylacetat als Lösemittel und Wasser, und
- Verwendung von großem Überschuß an L-Serin.

Diese Verfahren sind nur beschränkt geeignet zur Herstellung von Produkten für den Einsatz in Nahrungsergänzungsmitteln und sog. Functional Food, und zwar wegen der Restlösemittelgehalte, Instabilität in Formulierungen, hohen Rohstoff- und der Verfahrenskosten.

Vorteile des Verfahrens gemäß der Erfindung sind:

- Die Lösungsmittelfreiheit, da die Reaktion in einem einphasigen System unter Verwendung von Wasser als Lösemittel stattfindet.
- Der Einsatz handelsüblicher Rohstoffe, nämlich Phospholipase D,L-Serin, Calciumchlorid, Phospholipide (Lecithine).
- Die Verwendung eines Substrates in natürlicher Zusammensetzung in deren natürlichen Zusammensetzungen, nämlich Lecithine (zum Beispiel aus Soja/Ei) bis zum aufgereinigten Phosphatidylcholin.
- Der Einsatz von L-Serin in geringer Menge, nämlich in einer Dosierung, bezogen auf Substrat im Bereich von 0,2 : 1 bis 2 : 1 und dadurch eine deutliche Reduzierung des Überschusses von bis zum 50 : 1 auf 0,2 : 1, wobei die theoretisch benötigte Menge 0,14 : 1 ist.

Weitere Vorteile des Verfahrens sind:

- die hohe Selektivität für die Umwandlung von PC in PS und,
- dass nur wenig Nebenreaktionen von PC-PA auftreten, zum Beispiel Hydrolyse von PC in PA.

Gemäß der Erfindung wird in einem bevorzugten Fall wie folgt vorgegangen:

Lecithin wird in Wasser dispergiert (1–20%-ig) vorzugsweise 5%-ig und dazu das L-Serin gegeben. Die Phospholipase D und CaCl<sub>2</sub> wird in einem kleinen Teil des Wassers gelöst und anschließend in die Dispersion quantitativ überführt. Die Dispersion wird über einen Zeitraum von (vorzugsweise 10–20 h) bei vorzugsweise RT gerührt.

Nach Beendigung der Reaktion wird das entstandene Calciumsalz des Phosphatidylserins mittels bekannter Trennverfahren aus der wässrigen Phase abgetrennt, da dieses in Wasser unlöslich ist.

Das freie L-Serin und Cholin im Produkt kann durch eine weitere Wäsche mit Wasser entfernt werden.

Das Produkt kann dann getrocknet werden, z. B. Gefrier- oder Sprühtrocknung. Um die Rest-Enzymaktivität zu beseitigen, kann eine Inaktivierung z. B. durch eine sich anschließende Ethanolextraktion des Reaktionsproduktes vorgenommen werden.

Gleichzeitig erzielt man dabei PS-angereicherte Produkte. Dies führt zu stabilen Produkten, die keine Rest-Enzymaktivität aufweisen. Die Umwandlung der Ca-Salze in z. B. freies PS oder PS-Natriumsalz kann nach irgendeinem bekannten Verfahren durchgeführt werden.

Durch Einbeiten oder Einschließen von PS und PS-haltigen Produkten in einem Hartfett, das bei Raumtemperatur fest ist, lassen sich mit gemäß der Erfindung hergestellten

PS-Produkten stabile Formulierungen in wässrigen Systemen entwickeln, da das Produkt vor hydrolytischen Reaktionen geschützt ist. (z. B. Anwendung für Getränke, in denen seitverkapseltes PS enthalten ist, ohne dass das PS hydrolysiert werden kann). Für einen Einstieg in Weichgelatinekapseln wird der Schmelzpunkt des Fettes so gewählt, dass er minimal unterhalb der Verkapselungstemperatur liegt.

Da das Phosphatidylserin im Inneren der Kapsel in einem Fett eingebettet ist, das bei Raumtemperatur nicht schmilzt, bei Körpertemperaturen – also unterhalb von 37° – jedoch flüssig ist, sorgt es dafür, dass der Wassergehalt der Gelatinemasse nicht auf das eingeschlossene PS einwirkt. Der Vorteil ist dann, dass überhaupt keine Hydrolyse auftritt. Es lässt sich ein Schmelzpunkt einstellen, der so niedrig ist, dass im Magen-Darm-Trakt jedenfalls bei Körpertemperaturen eine gute Aufnahme des PS möglich ist.

Dieses Prinzip kann gemäß der Erfindung auch auf andere Substanzen angewendet werden, die durch das Wasser der Weichgelatinekapseln angegriffen werden könnten.

## Beispiel für ein Hartfett

SATINA 15 ist ein laurinhaltiges Pflanzenfett, fraktioniert, gehärtet und raffiniert.

## Kennwerte

Jodzahl (Wijs):	7 g/100 g
Freie Fettsäure (Laurinsäure):	0.03%
Peroxydzahl:	0.1 meqO <sub>2</sub> /kg
Trans Fettsäure (annähernd):	< 1%
Lovibond Farbe (5.25°Zelle)	
Gelb:	4.2
Rot:	0.7
Prozent Festfettanteil bei:	
20°C:	71%
25°C:	42%
30°C. 1 35°C:	0%
Steigschmelzpunkt:	29°C

## Eigenschaften von L-Serin

(S)-2-Amino-3-hydroxy-propanoic acid
L-2-Amino-3-hydroxy-propionic acid
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>
M = 105.09 g
White crystals or crystalline powder
Practically odourless
Solubility: 35.9 g/100 g H <sub>2</sub> O 20°C

## Patentansprüche

Verfahren zur Herstellung von Phosphatidylserin (PS) bzw. von PS angereicherten Produkten, bei welchem Lecithin in Wasser dispergiert (1 . . 20%) und L-Serin hinzugegeben wird, Phospholipase D und Ca Cl<sub>2</sub> in Wasser gelöst und quantitativ in die Dispersion überführt und ungefähr 10 bis 20 h bei Raumtemperatur gerührt werden, das entstandene in Wasser unlösliche Calciumsalz des PS aus der wässrigen Phase abgetrennt wird, das freie L-Serin und Cholin durch eine Wäsche mit Wasser entfernt wird und nach Ethanolextraktion das PS bzw. die PS angereicherten Produkte erzielt wird/werden.